



Studies on molecular basis of cyanobacterial outer membrane function and its evolutionary relationship with primitive chloroplasts

著者	木幡 光
号	15
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第359号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00122721

	こわた ひかる
氏 名（本籍地）	木幡 光
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第 359 号
学位授与年月日	平成 3 0 年 3 月 2 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 ， 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生態システム生命科学専攻
論 文 題 目	Studies on molecular basis of cyanobacterial outer membrane function and its evolutionary relationship with primitive chloroplasts（シ アノバクテリア外膜の性質及び存在意義の解明 と葉緑体成立過程についての考察）
博士論文審査委員	（主査） 教授 高橋 秀幸 教授 有本 博一 教授 永田 裕二

論文内容の要旨

序論

葉緑体の起源は、従属栄養真核細胞の祖先に細胞内共生したシアノバクテリア（グラム陰性の酸素発生型光合成細菌）であることは広く受け入れられている。「微生物（シアノバクテリア）の機能を利用する」ことにおいて植物は史上最も成功した生物の一つと言える。この点で、シアノバクテリアから葉緑体への変貌機構は応用微生物学的な観点からも極めて興味深い。シアノバクテリアと宿主細胞の間で共生関係を確立するためには、(A) 宿主細胞と共生シアノバクテリア間の細胞分裂時期の同調、(B) 共生シアノバクテリア膜を介した物質移送経路の構築、といったプロセスが必要であるが、後者がどのようなメカニズムで達成されたかはほとんど分かっていない。

近年、児島らは葉緑体膜を介した物質輸送機構の成立メカニズムを探索するための切り口として、シアノバクテリア外膜蛋白質のほとんどが現存植物系統で失われていることに焦点を当てた。研究対象として、最も原始的な葉緑体の一つとして考えられている灰色藻 *Cyanophora paradoxa* の葉緑体（ムロプロラストと呼ばれる）の外膜が解析された。ムロプロラストは内膜、細胞壁ペプチドグリカン、外膜から構成されるシアノバクテリア様の膜構造を残している。筆者らは最も存在量の多い外膜蛋白質 CppS と CppF が非シアノバクテリア系統（Planctomycetes 門細菌）に由来し、分子量 1000 以下の物質の非選択的チャネルとして機能することを発見した。加えて、ムロプロラストのペプチドグリカンにおいて、シアノバクテリアでは見られない共有結合性ポリアミンが発見されており、シアノバクテリアの細胞表層の構造・機能の分子基盤が葉緑体誕生過程で劇的な再構成を経たことを示唆している。

しかし、シアノバクテリアの細胞表層の構造、機能が十分に明らかにされていないことから、共生シアノバクテリアにおける細胞表層再構成の生物学的、進化的な意味を十分に解釈することはできていない。本研究ではシアノバクテリアにおける (i) 外膜物質透過の分子基盤、及び (ii) 外膜の生理的役割の解明を目的とした。研究対象として、シアノバクテリアのモデルとして *Synechocystis* sp. PCC 6803（以下、PCC 6803）を用いた。また、外膜について最も幅広く研究されている従属栄養性グラム陰性のモデル細菌である大腸菌の外膜の構造、機能との比較解析を行った。

第一章 シアノバクテリア PCC 6803 の外膜透過性：低分子有機栄養物質を用いた受動拡散の解析により、外膜の著しい低透過性が解明された

大腸菌などの従属栄養性グラム陰性細菌の外膜は分子量 600 以下の親水性物質を透過させる外膜チャネル Porin により生育に必須な栄養を細胞内へ拡散流入させる。一方で、シアノバクテリアの外膜透過性や Porin の存在についてはほとんどわかっていない。本章では、糖やアミノ酸、無機塩を基質として、生細胞及び外膜蛋白質を再構成させたリボソームを用いて PCC 6803 の外膜透過性を解析した。その結果、PCC 6803 の外膜透過性は大腸菌の 20 倍以上低いことが分かった。また、外膜蛋白質欠損株の外膜透過性の解析により、主要な外膜蛋白質である Slr1841、Slr1908、Slr0042 は糖やアミノ酸の有機栄養の透過性を示さず、無機塩類のみを透

過し、一方で外膜での存在量の少ない Slr1270 だけが有機物透過性を示すことが明らかとなった。Slr1270 の有機物透過性は組換え Slr1270 発現大腸菌外膜を用いた透過性解析によっても確認された。以上の結果より、PCC 6803 外膜は 低存在量の Slr1270 (総外膜蛋白質の約 4%) が有機物透過性チャンネルとして機能する一方で、無機塩類透過性チャンネル Slr1841、Slr1908、Slr0042 が総外膜蛋白質の約 80%を占めることで大腸菌に比べて著しく低い透過性を示すことが明らかとなった。独立栄養性生物にとって外環境から取り込む必要がある物質は無機塩だけで十分であると考えられることから、外膜の低透過性はシアノバクテリアの生活様式に適した性質であるといえる。

第二章 シアノバクテリア PCC 6803 における外膜の生理的役割：従属栄養性グラム陰性細菌の外膜との違い

第一章では PCC6803 株の外膜透過性が大腸菌の 20 倍以上低いことを実証した。このことから、外膜の生理的役割について、外環境の有毒物質から細胞を防御する障壁、または細胞生理の維持に必要な物質の漏出防止の二つの可能性が考えられた。本章では PCC 6803 の外膜の生理的役割を明らかにするため、(i) 薬剤感受性、(ii) 外膜破壊薬剤による影響、(iii) 外膜不安定化変異による影響を調べた。これら全てについて大腸菌との比較解析を行った。

第一節 大腸菌外膜の生理的役割：外膜不安定化変異表現型の定量的特徴づけ

大腸菌では上記 (i) 及び (ii) は十分明らかにされているため、これらについては過去の研究の再現性を確認するに留め、本研究では(iii)「外膜不安定化変異による影響解析」に注力した。大腸菌の外膜不安定化変異株としてムレインリボタンパク質 (Lpp) 欠損株 (Δlpp) 及び Tol-Pal 複合体欠損株 ($\Delta tol-pal$) を用いた。これらは、外膜不安定化変異として知られているが、外膜の透過性や細胞生理にどのような影響を与えるかは定量的にはわかっていない。まず、上記欠損株の生育速度を調べたところ、野生株とほとんど変わらなかった。このため Δlpp と $\Delta tol-pal$ の外膜透過性の変化について焦点当てて解析を行った。透過性解析は生細胞における Benzylpenicillin の外膜透過速度を評価した。その結果、 Δlpp は野生株とほとんど透過性が同じであったのに対し、 $\Delta tol-pal$ は野生株の 3–5 倍高い外膜透過性を示した。さらに、変異株の薬剤感受性を評価するため、様々な薬剤の最小生育阻害濃度を調べた結果、 Δlpp は野生株と薬剤感受性が同程度であったが、 $\Delta tol-pal$ はほとんどの薬剤に対して高感受性を示した。本節では大腸菌の外膜透過性と薬剤感受性の関連性を定量的に明らかにし、大腸菌外膜の最も顕著な生理機能が有害物質に対する透過障壁であることを実証した。

第二節 PCC 6803 における外膜の生理的役割：大腸菌との違い

PCC 6803 の薬剤感受性を最小生育阻害濃度により評価したところ、PCC 6803 は様々な薬剤に対して大腸菌と同等、あるいはむしろ高い感受性を示した。外膜破壊ペプチドである Polymyxin B nonapeptide (PMBN) 処理により外膜高透過性化させた時の薬剤感受性の変化を解析した結果、大腸菌では PMBN 処理により疎水性薬剤に対して 4–100 倍感受性が上昇したのに対し、PCC 6803 の感受性の上昇は最大でも 4 倍であった。よって、PCC 6803 外膜は薬剤に対する透過障壁としての役割は小さいことが示唆された。グラム陰性細菌の外膜の安定的維

持には、外膜—ペプチドグリカン間の接着作用が必須であることが知られている。PCC 6803 における外膜不安定化変異株の表現型を解析するため、ペプチドグリカン結合性の外膜蛋白質 Slr1841、Slr1908、Slr0042 の欠損株の作製を試みた。Slr1908 欠損株と Slr0042 欠損株は単離できた一方で、外膜で最も発現量が高い Slr1841 の欠損株は作製できなかった。このことから、PCC 6803 の生存に外膜の安定化が必須である事が示唆された。これらの結果から、PCC 6803 外膜は外環境の有害物質に対する障壁としての役割は小さく、細胞の生存に必須な何らかの別の役割を果たしていることが明らかとなった。その役割の一つの可能性として、生育に必要な物質の漏出防止が考えられた。

総合論議

第一章では、PCC 6803 の外膜透過性が大腸菌と比べて著しく低いことを明らかにした。第二章では、大腸菌と比べ有害物質に対する透過障壁としての PCC 6803 外膜の寄与が著しく低いことを明らかにした。外膜の役割の一つとして、生育に必須な物質の細胞外への漏出を防ぐ可能性が考えられた。

葉緑体の起源となったシアノバクテリアが現存系統と同様に低透過性の外膜を有していたと仮定すると、細胞内共生したシアノバクテリアの外膜低透過性の解消は、宿主真核細胞との物質輸送を確立するために必須であったと考えられる。シアノバクテリアから葉緑体へ変換する過程において、他系統由来の高透過性外膜チャンネルが取り込まれることによりシアノバクテリア外膜の低透過性が解消され、葉緑体と宿主細胞質の間で容易に物質をやり取りする経路が構築された可能性が示唆された。今後の研究で、シアノバクテリア外膜の生理的役割を詳細に解明できれば、葉緑体成立過程における外膜再構成の意味についてもより深く考察できるようになるだろう。

シアノバクテリアの外膜の特性が本研究により解明されたことで生物工学分野への応用も期待される。シアノバクテリアは光合成による持続可能な物質生産系としての利用可能性を秘めているが、低透過性の外膜は細胞外への物質生産に対して負に作用することから、物質生産性を制限する主要因であると考えられる。シアノバクテリアに対する外膜不安定化変異導入や外膜破壊薬剤の利用、高透過性チャンネルの導入などにより外膜を高透過性化させる事で物質生産能力を大きく向上できると考えられる。

論文審査結果の要旨

葉緑体の起源は原始真核細胞に細胞内共生した藍藻である。しかし、どのような過程を経て葉緑体へと変貌したかは不明である。2016 年に、最も原始的な葉緑体の一つとされる灰色藻 *Cyanophora paradoxa* の葉緑体の外膜蛋白質のほとんどが藍藻とは異なる細菌系統由来の蛋白質で占められており、これらの蛋白質が低分子化合物を非選択的に透過するチャネル機能をもつことが報告された。この事実は、藍藻外膜の物質透過機構が葉緑体成立初期には既に劇的な変化を遂げていることを示している。しかし肝心の藍藻外膜の性質・機能に関する理解が不十分なため、上記変化の生物学的、進化的な意味がわかっていない。そこで、木幡氏は藍藻モデル種 *Synechocystis* sp. PCC 6803（以下 PCC 6803）を対象とし、外膜物質透過の分子基盤及び外膜の生理的役割を解析した。

第一章では、PCC 6803 の生細胞及び外膜蛋白質を再構成したリポソームを用い、糖やアミノ酸、無機塩類に対する外膜透過性を解析した。その結果、総蛋白質量の約 80% を占める主要な外膜蛋白質である Slr1841、Slr1908、Slr004 が無機塩類のみを透過するチャネルであり、存在量の少ない（総蛋白質量の約 4%）Slr1270 だけが糖やアミノ酸等の有機物透過性を示すチャネルであることを明らかにした。また、PCC 6803 の外膜透過性はグラム陰性細菌のモデル種である大腸菌の外膜と比較して 20 倍以上低いことを示した。

第二章では、藍藻外膜の生理的役割について、大腸菌外膜との比較の観点から解析を行った。まず、大腸菌外膜の不安定化を起こす Tol-Pal 変異により、外膜透過性が 3-5 倍上昇すること、それに伴い細胞の薬剤感受性が最大で約 40 倍上昇することを実証し、外膜透過性と細胞の薬剤耐性との直結的關係性を明示した。一方で PCC 6803 においては、大腸菌とは異なり低濃度の外膜破壊薬剤の存在下で生育阻害が起こること、外膜不安定化変異により生育阻害が起こることを明らかにした。これらの結果により、PCC 6803 の外膜が細胞の生育そのものに必須の機能を担うという、一般的なグラム陰性細菌とは顕著に異なる生理機能を持つことを示した。

これらの結果から、藍藻外膜の低透過性を解消して宿主細胞質との物質輸送経路を構築することが葉緑体成立への工程の一つであった可能性が初めて示唆された。以上の成果は、木幡氏が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、木幡氏によって提出された論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。